

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
Keemia Instituut

Vahur Toss

**Glüfosaadi määramine pinnaveest SPE HPLC/ESI/MS/MS
metoodikaga: kitsaskohad ja nende lahendamine**
Magistritöö (30 EAP)

Juhendaja: Anneli Kruve, PhD

Tartu, 2013

Sisukord

Sisukord	2
Lühendid	4
Sissejuhatus	5
1. Kirjandusülevaade	6
1.1 Glüfosaat	6
1.2 Glüfosaadi määramine	7
1.3 Glüfosaadi määramine SPE HPLC/ESI-MS metoodikatega	8
1.4 ME SPE HPLC/ESI/MS analüüsil	8
2. Eksperimentaalne osa	11
2.1 Reaktiivid ja laborivahendid	11
2.2 HPLC/ESI/MS instrument	11
2.3 Prooviettevalmistus	13
3. Tulemused ja arutelu	15
3.1 Määramismetoodika väljatöötamine	15
3.2 Proovi kontsentreerimise mõju	15
3.3 Boraatpuhvri mõju	17
3.4 ¹³ C-glüfosaadi poolt põhjustatud ME	19
3.5 Kromatograafilise gradiendi kiiruse mõju ME ja LoD	22
3.6 Mobiilfaasi puhverlahuse kontsentratsiooni ja pH mõju	24
3.7 MS parameetrid	27
3.8 Metoodika valideerimine	28
3.9 Glüfosaadi sisaldused Võrtsjärves	29
Kokkuvõte	33
Summary	34

Kasutatud kirjandus	36
---------------------------	----

Lühendid

$[A^+]_s$	Analüüdi kontsentratsioon tilga pindfaasis
$[B^+]_s$	Segava komponendi kontsentratsioon tilga pindfaasis
$[E^+]_s$	Elektrolüüdi kontsentratsioon tilga pindfaasis
[Q]	ESI tilga laengu pindkontsentratsiooni liig
AMPA	Aminometüülfosfoonhape
A_{proov}	Analüüdi piigipindala proovimaatriksis
a_{proov}	Analüüdi kalibreerimisgraafiku tõus proovimaatriksis
A_{standard}	Analüüdi piigipindala standardlahuses
a_{standard}	Analüüdi kalibreerimisgraafiku tõus standardlahuses
C_A	Analüüdi analüütiline kontsentratsioon
C_B	Segaja analüütiline kontsentratsioon
C_E	Elektrolüüdi analüütiline kontsentratsioon
EPSPS	5-enoolpüruvüülsikimaat-3-fosfaadi süntaas
ESI	Elektropihustusionisatsioon
FMOC-Cl	Fluorenüülmetüülkarbonüülkloriid
HPLC	Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia
IE	Ionisatsiooni efektiivsus
K_A	Analüüdi tilga sise- ja välisfaasi vaheline jaotuskoefitsent
K_B	Segaja tilga sise- ja välisfaasi vaheline jaotuskoefitsent
K_E	Elektrolüüdi tilga sise- ja välisfaasi vaheline jaotuskoefitsent
LoQ	Kvantiseerimispiir
LoD	Avastamispiir
ME	Maatriksefekt
MeCN	Atsetonitriil
MS	Massispektromeetria
m/z	Massi laengu suhe
R^2	Lineaarse regressiooni korrelatsioonikoefitsendi ruut
SPE	Tahkefaasekstratsioon
t_R	Retentsiooni aeg
UV-Vis	Ultraviolet-nähtavaala spektroskoopia

Sissejuhatus

Käesoleva töö eesmärgiks oli monitoorida glüfosaadi ja selle peamise laguprodukti aminometüülfosfoonhappe (AMPA) sisaldusi Võrtsjärves, viies Võrtsjärve vesikonnas asuvas jões (Tänassilma, Tarvastu, Ohne, Väike Emajõgi ja Suur Emajõgi) ning kahes Võrtsjärve lähedal asuvas põlluäärses piirikraavis (Kobilu ja Konguta) ETF grandi 8373 raames ajavahemikus mai 2011 kuni november 2012. Selle eesmärgi täitmiseks oli vajalik välja töötada meetoodika glüfosaadi ja AMPA sisalduste määramiseks mageveekogudes, kasutades tahkefaasekstraktsiooni (SPE) ja kõrgefektiivset vedelikkromatograafiat (HPLC) koos massispektromeetriaga (MS).

Glüfosaat on laialdaselt kasutatav tärkamisjärgne üldhävitava toimega pestitsiid, mille põhilised kasutusalaad on põllumajandus ja metsandus. Levinuim glüfosaati sisaldav produkt on Monsanto kompanii poolt toodetav RoundupTM. Glüfosaadi määramine mageveekogudes on tähtis, kuna antud pestitsiid kujutab kõige suuremat ohtu just vees elavatele organismidele ning glüfosaadi järgi on leitud mitmetes jõgedes ja järvedes üle maailma.

Kasutades Tartu Ülikooli Katsekoja laboris olevat aparatuuri (kõrgefektiivnevedelikkromatograafia ühendatuna elektropihustusionisaatsiooni ja ioonlõks-massispektromeetriaga) (HPLC/ESI/MS) püstitati tööle järgmised eesmärgid:

- kirjandusele tuginedes välja töötada meetoodika glüfosaadi ja AMPA määramiseks looduslikus vees,
- leida ning optimeerida sobiv prooviettevalmistus-, vedelikkromatograafiline- ja massispektromeetriline meetoodika glüfosaadi määramiseks,
- kirjeldada meetoodika tundlikkust ja täpsust oluliselt mõjutavaid etappe, mis on varasemalt kirjanduses mainimata,
- viia läbi glüfosaadi ja AMPA monitooring Võrtsjärve vesikonnas ETF grandi 8373 raames ajavahemikus mai 2011 kuni november 2012.

1. Kirjandusülevaade

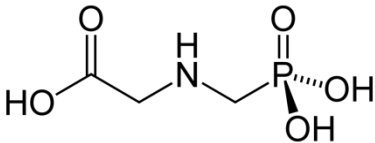
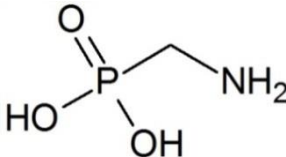
1.1 Glüfosaat

Glüfosaat (andmed Tabelis 1) on üldhävitava toimega tärkamisjärgne pestitsiid, millel põhinevaid taimekaitsevahendeid kasutatakse nii tööstuses kui ka kodumajapidamises peamiselt umbrohu tõrjeks. Toimemehhanismilt on glüfosaat kloroplastis asuva ja fenüülalaniini, türosiini ning trüptofaani sünteesi katalüüsiva 5-enoolpüruvüülisikimaat-3-fosfaadi süntaasi (EPSPS) inhibiitor. EPSPS leidub kõigis taimedes, seentes ja bakterites, kuid mitte imetajates, kalades ja lindudes. Viimased peavad EPSPS poolt sünteesitavaid aminohappeid saama toidust. Antud põhjusel peeti glüfosaati selle turule toomisel 1970. aastatel inimestele ja teistele imetajatele täiesti ohutuks. Sellest ajast alates on aga läbi viidud hulganisti uuringuid, mis on näidanud glüfosaadi ohtlikkust peamiselt vees elavate organismide suhtes [1,2], muutes eriti oluliseks glüfosaadi uurimise erinevates veekogudes, kuhu see võib sattuda vihmaveega pinnasest [3] või kanduda tuulega otse õhust [4]. Samuti on näidatud glüfosaadi mõju imetajatele [5], kuid ainult üksikutes uuringutes on leitud olulist mõju looduses (alla 1 mg/l) esinevate kontsentratsioonide tasemel [6]. Pigem on näidatud, et mürgisus imetajatele ja kaladele tuleneb glüfosaadil baseeruvates taimekaitsevahendites kasutatavatest pindaktiivsetest ühenditest, mitte glüfosaadist [7].

Glüfosaadi vähene ohtlikkus looduses tuleneb peamiselt selle madalatest sisaldustest. Suurimad pinnaveses leitud glüfosaadi sisaldused on määratud Lõuna-Ameerikas (suurusjärgus 1 mg/l), kus on levinud glüfosaadi suhtes resistentsete taimede kasvatamine [8]. Madalad kontsentratsioonid on tingitud glüfosaadi suhteliselt kiirest lagundamisest pinnases elavate mikroobide poolt. Poolestusaeg sõltub pinnase orgaanilise süsiniku, alumiiniumi, raua ja fosfaadi sisaldusest ning varieerub mõnest kuni rohkem kui saja päevani [3].

Glüfosaadi peamiseks laguproduktiks on aminometüülfosfoonhape (AMPA) (andmed Tabelis 1), mis laguneb pinnases tavaliselt aeglasemalt kui glüfosaat. AMPA aeglasemat lagunemist seletatakse tugevama adsorptsiooniga pinnase osakestele ja/või mikroorganismide väiksema mõjuga AMPA lagunemisele.

Tabel 1 Glüfosaadi ja AMPA üldandmed [9]

	Glüfosaat	AMPA
CAS nimi	N-(fosfometüül)glütsiin	(aminometüül)fosfoonhape
CAS registri number	1071-83-6	1066-51-9
Triviaalnimetus	Glüfosaat	AMPA
Molekulvalem	$C_3H_8NO_5P$	CH_6NO_3P
Molekulmass (g/mol)	169,01	111,04
Kanooniline struktuur		
pK _a väärtused	0,78; 2,29; 5,96; 10,98	1,48; 9,93
Füüsikalised parameetrid	Värvitu, lõhnatu, kristalne tahkis	Värvitu, lõhnatu, kristalne tahkis
Lahustuvus	Vees 12 g/l 25°C juures. Lahustumatu enamustes orgaanilistes solventides	

1.2 Glüfosaadi määramine

Laia kasutuse tõttu on glüfosaati määratud mitmete meetoditega paljudes maatriksites. Kõige levinumad on kromatograafilised meetodid, millest vesikeskkonnas määramisel eelistatakse vedelikkromatograafiat gaaskromatograafiale lihtsama prooviettevalmistuse tõttu. Vedelikkromatograafi on detekteerimiseks ühendatud peamiselt ultraviolet-nähtavaala (UV-Vis), fluorestsents- või MS-detektoriga [10].

Kuna glüfosaat ei sisalda kromo- ega fluorofoore, ei ole derivatiseerimata kujul määramine spektroskoopiliste meetoditega võimalik. Samuti ei ole, glüfosaadi polaarsusest tulenevalt, võimalik tema eraldamine maatriksist pöördfaaskromatograafiaga, mis on suurte proovikoguste korral hädavajalik. Need probleemid on enamasti lahendatud peamiselt aminohapete analüüsiks kasutatava 9-fluorenüülmetüül kloroformiaadiga (FMOC-Cl) [10] derivatiseerimisel. FMOC-rühm aitab oma mittepolaarsusega lisaks kaasa ka derivaadi ioniseerumisele ESI-allikas, kui detektorina kasutatakse MS [11]. Tulenevalt madalatest kontsentratsioonidest keskkonnas, mis esitavad nõudmised meetodika määramispiirile, on proovide kontsentreerimiseks kasutatud erinevate statsionaarsete faasidega tahkefaasekstraktsioon (SPE) padruneid nii *on-* kui ka *off-line* režiimis [10]. SPE padrunite kasutamine vähendab maatriksi komponente proovis ning võib seetõttu keerulise maatriksiga proovides märgatavalt maatriksefekti (ME) vähendada.

1.3 Glüfosaadi määramine SPE HPLC/ESI-MS metoodikatega

SPE-l ja HPLC/ESI/MS-l põhinevaid glüfosaadi määramismetoodikaid on kirjanduses avaldatud mitmeid. Metoodika eeliseks on kõrge tundlikkus ja hea selektiivsus, mis tulenevad MS detektori omadustest. Puuduseks võib lugeda kõrget tundlikkust maatriksefekti (ME) suhtes, mis tuleneb ESI allika omapäradest. ME ja prooviettevalmistusest tulenevate kadude arvesse võtmiseks kasutatakse peamiselt isotoopmärgistatud sisestandardeid.

Prooviettevalmistus algab isotoopmärgistatud standardiga rikastamisega. Kuna glüfosaat võib metalliioonidega komplekse moodustada [12], viiakse teise etapina läbi hapestamine, mille eesmärgiks on lõhkuda glüfosaat-metallioon kompleksid, mis võivad takistada glüfosaadi derivatiseerimist. Vabasse vormi viidud glüfosaat derivatiseeritakse, kasutades FMOC-Cl, kõrge pH juures, mille korral on glüfosaadi aminorühm deprotoneeritud. Derivatiseerimine tagab glüfosaadi seondumise pöördfaas statsionaarfaasiga ja parandab ionisatsiooniefektiivsust (*IE*) ESI allikas. Derivatiseeritud proov kantakse SPE-padrunisse, millest see elueeritakse, pärast maatrikskomponentidest puhastamist, metanooliga. Metanooli faas aurutatakse kokku N₂ voolus kõrgendatud temperatuuril, et tõsta glüfosaadi kontsentratsiooni proovis. Kokkuaurutatud proov lahustatakse üles vees ja süstitakse HPLC/ESI/MS süsteemi. Pöördfaaskolonnides toimub elueerimine gradientprogrammiga, milles kasutatakse mobiilfaasina puhverlahuse ja metanooli või atsetonitriili (MeCN) segu. Ioniseerimist ESI allikas on läbi viidud nii negatiivses kui ka positiivses režiimis, millest viimane on näidanud kõrgemat tundlikkust [13].

Kasutatud on ka metoodikaid, kus veeproov kontsentreeritakse enne glüfosaadi derivatiseerimist, kasutades tugevaid anioonvahetus SPE padruneid [14], ning samuti metoodikad, kus glüfosaat eraldatakse maatriksi komponentidest kasutades ionkromatograafiat [15], millele järgneb glüfosaadi derivatiseerimine.

1.4 ME SPE HPLC/ESI/MS analüüsil

SPE HPLC/ESI/MS-l põhinevad metoodikad on tuntud oma kõrge selektiivsuse poolest, kuid võivad keerulistes maatriksites või ulatusliku proovikontsentreerimise korral olla tundlikud ME suhtes. ME on *IE* muutus, mida põhjustavad analüüdiga koos HPLC-st elueeruvad maatriksi komponendid ESI allikas ja seda võib väljendada kui:

$$ME = \frac{A_{\text{proov}}}{A_{\text{standard}}} \cdot 100\%, \quad (1)$$

milles A_{proov} ja A_{standard} on proovi ja standardi piigipindalad samal analüüdi kontsentratsioonil. Juhul kui tahetakse iseloomustada ME laiemas kontsentratsioonide vahemikus, asendatakse piigipindalad kalibreerimisgraafiku tõusudega:

$$ME = \frac{a_{\text{proov}}}{a_{\text{standard}}} \cdot 100\%, \quad (2)$$

milles a_{proov} ja a_{standard} on kalibreerimisgraafiku tõusud vastavalt proovimaatriksis ja standardlahuses.

Erinevate analüütide ja maatriksite kombinatsioonide korral on kirjeldatud nii signaali mahasurumist rohkem kui 90% [16] kui ka mitmesaja protsendilist signaali tugevnemist [17]. Sellest lähtuvalt on oluline ME võimalust arvesse võtta nii meetodika arendamisel kui ka valideerimisel.

ME on HPLC/ESI/MS meetodikates põhjustatud analüüdiga samal ajal ESI allikasse jõudvatest maatriksi komponendidest, mis toovad peamiselt kaasa signaali mahasurumise. Mahasurumine võib olla põhjustatud mitmest erinevast faktorist või nende kombinatsioonist. Esiteks võivad koos elueeruvad komponendid tõsta eluendi viskoossust ja pindpinevust, mis aeglustab solvendi aurustumist ja seega ka Rayleigh piiri (punkt, kus laetud osakeste vaheline tõukejõud ületab tilga pindpinevuse ja tilgast eralduvad väiksemad tilgad) saavutamist. See tähendab, et tilkade aurustumiskiirus väheneb, rohkem ioone jääb tilkadesse ning ei pääse gaasifaasi, kust neid MS saaks analüüsida. Seega väheneb analüütilist signaali andvate analüüdi molekulide arv, mis jõuavad gaasifaasi [18]. Samuti võivad koos elueeruvad maatriksi komponendid vähendada analüüdi kontsentratsiooni tilga pindfaasis, millest toimub ionide aurustumine gaasifaasi [18]. Selle mehhanismi iseloomustamiseks on pakutud välja teoreetiline mudel, mis kirjeldab ESI ionisatsiooni efektiivsust sõltuvalt analüüdi afiinsusest tilga pinnale (valem 3) [19].

$$\frac{K_A}{K_B} = \frac{[A^+]_S(C_B - [B^+]_S)}{[B^+]_S(C_A - [A^+]_S)} \quad (3)$$

kus $[A^+]_s$ ja $[B^+]_s$ on ainete A ja B kontsentratsioonid tilga pinnafaasis, C_A ja C_B on A ja B analüütilised kontsentratsioonid lahuses ning K_A ja K_B on vastavad jaotuskoefitsendid tilga pinnakihi ja sisemuse vahel.

Maatriksefekti arvesse võtmiseks on HPLC/ESI/MS analüüsidel kasutatud erinevaid lähenemisi, mis põhinevad kas ME vähendamisel või selle arvesse võtmisel. ME vähendamiseks on muudetud ESI polaarsust [20], vähendatud ESI voolukiirust [21], proovi on puhastatud kasutades SPE ekstraksiooni [22] või suuruselalduskromatograafiat [23], vahetatud ekstraksioonisolventi nõrgema elueeriva jõuga solvendi vastu [24], tõstetud kromatograafilist retentsiooni [25], kasutatud proovi lahjendamist [18] või optimeeritud MS parameetreid [26].

Kuna eelpoolnimetatud lähenemised ei kaota ME täielikult, võivad olla aeganõudvad ning vähendada meetodika tundlikkust on väljatöötatud mitmeid meetodeid ME arvesse võtmiseks. Kasutatud on analüüdile struktuurselt sarnaseid ühendeid sisestandardina [27], kolonni eelset [28] ja järgset lisamismeetodit [29], kasutatud maatriksvastavat kalibreerimist [30], kaja-piigi tehnikat [31] ja isotoopmärgistatud sisestandardeid [32]. Kuna ME ulatus võib sõltuda uuritava analüüdi retentsiooni ajast (t_R) on oluline adekvaatse hinnangu andmiseks õigesti hinnata ME just analüüdi retentsiooniajal. Selleks sobivad hästi isotoopmärgistatud sisestandardid, eriti ^{13}C -märgistatud, mis elueeruvad analüüdile väga lähedastel retentsiooni aegadel ning omavad samu keemilisi omadusi, mis tagab hea hinnangu maatriksefektile [32]. Samas on aga näidatud, et isotoopmärgistatud standardid ei ole alati võimelised ME arvesse võtma [33] ja et isotoopmärgistatud sisestandard ja analüüt võivad üksteise signaale mõjutada [34].

Kuna antud töö eesmärgiks oli välja töötada meetodika, mis oleks võimalikult tundlik, kuid samas ka tõene, kasutati nii ME arvesse võtmist isotoopmärgistatud sisestandardiga kui ka vähendamist SPE, kromatograafiliste parameetrite optimeerimise ja prooviettevalmistuse muutmisega.

2. Eksperimentaalne osa

2.1 Reaktiivid ja laborivahendid

Glüfosaadi, ^{13}C -glüfosaadi (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Saksamaa, 98,5%) ja AMPA (Sigma-Aldrich, Saksamaa, 99%) emalahused, kontsentratsiooniga 1000 mg/l, valmistati MilliQ vees (18,2 M Ω ×cm, Millipore Simplicity 185, Prantsusmaa). Tööstandardlahused valmistati emalahust MilliQ veega lahjendades. FMOC-Cl (Sigma-Aldrich, USA, 97%) lahustati atsetonitriilis (J.T. Baker, Holland, 99,8%). Derivatiseerimiseks kasutatav boraatpuhver pH=9,0 valmistati boorhapest (Реахим, NSVL, puhas analüüsiks) ja naatriumhüdroksiidist (Chemapol, Tšehhoslovakkia, 97%). SPE padruni elueerimiseks kasutati metanooli (J.T. Baker, Holland, 99,8%). HPLC/MS mobiilfaas valmistati kasutades MeCN ja puhverlahuseid, mis valmistati ammoniumatsetaadist (Fluka, Šveits, $\geq 99,0\%$) ja sipelghapest (Fluka, Šveits, 98%). Kõik lahused valmistati kasutades Eppendorfi (Saksamaa) automaatpipette (5000, 1000, 100, 20 μl). Proovi kontsentreerimiseks ja puhastamiseks kasutati StrataTM – X polymeric Solid Phase Extraction padruneid (200 mg/3 ml) (Phenomenex, USA).

2.2 HPLC/ESI/MS instrument

Glüfosaadi lahuste analüüsiks kasutati HPLC/MS instrumenti firmalt Agilent, mis koosnes järgnevatest osadest: Agilent 1100 seeria vaakumdegasaator, binaarne pump solvendi valiku klapiga, automaatne proovisisestussüsteem, kolonni termostaat kahele analüütilisele kolonnile, UV-Vis diodrividetektor G1315B ningioonlõks-massispektromeeter Agilent LC/MSD Trap XCT. MS ionoptika parameetrid, mis optimeeriti maksimaalse tundlikkuse saavutamise protseduurist lähtuvalt [26], on toodud Tabelis 2.

HPLC ja MS olid omavahel ühendatud ortogonaalse elektropihustus-ionisatsioonallikaga (positiivses režiimis), mille pihustus- ning kuivatusgaasiks kasutati trassilämmastikku.

Tabel 2 Optimeeritud ioonoptika parameetrite väärtused.

	Glüfosaat ja ¹³ C-glüfosaat	AMPA
Capillary (V)	-4500	-4500
Skimmer (V)	22,0	22,0
Cap exit (V)	70	70
Oct 1 DC (V)	11,0	11,0
Oct 2 DC (V)	1,0	1,0
Trap drive	35,0	35,0
Oct RF (Vpp)	280,0	280,0
Lens 1 (V)	-5,2	-5,2
Lens 2 (V)	-73,4	-73,4
Frag. CutOff	78	67
Frag. Amp. (V)	0,41	0,50

Töös kasutati analüütilist kolonni Phenomenex Synergi 4u Hydro-RP 80A pikkusega 250 mm, sisediameetriga 4,6 mm, osakese suurusega 4 µm, koos eelkolonniga SecurityGuard Cartridges AQ C18 pikkusega 2,0 mm, sisediameetriga 4 mm ja osakese suurusega 5 µm. Töös kasutati mitmeid erinevaid gradientprogramme, mis kasutasid MeCN ja mitme erineva pH ning kontsentratsiooniga ammooniumatsetaadist ja sipelghappest valmistatud puhvrit. Võrtsjärve vesikonnast võetud proovide glüfosaadi sisalduse määramiseks kasutati lõplikus meetodikas gradientprogrammi (Tabel 3) kasutades MeCN ja 5 mM ammooniumatsetaadist ja sipelghappest valmistatud puhverlahust pH = 5,0.

Tabel 3 Lõplikus meetodikas kasutatud gradientprogramm (tasakaalustusaeg 5 min)

Aeg (min)	%MeCN
0	20
15	100
20	100
22	20

2.3 Prooviettevalmistus

Analüüsiks võeti 25 ml proovi, mida rikastati ^{13}C -glüfosaadiga (proovile lisati 62,5 µl 200 µg/l ^{13}C -glüfosaadi lahust vees), et võtta arvesse pikast prooviettevalmistusest tulenevad kaod ning ESI allikast tulenev ME. Seejärel hapestati proov pH=1-ni kasutades 6 M HCl ja jäeti proov üheks tunniks seisma, et metalliioonidega komplekseerunud glüfosaat vabasse vormi viia. Proovi neutraliseerimiseks (pH~7) vajalik hulk 6 M KOH määrati tiitrides ühte proovi, kasutades automaatpipette ja pH-meetrit. Ülejäänud, samal päeval määratavad, proovid neutraliseeriti tiitrimiseks kulunud koguse lisamisega (proovide pH väärtust kontrolliti pH meetriga ning 7-st märgatavalt erinevate pH väärtuste korral korregeeriti pH-d täiendavalt). Seejärel lisati lahusele 3 ml MeCN, et tõsta vees vähelahustuva derivatiseeriva reagenti FMOC-Cl lahustuvust proovis, ning viidi proov pH=9 juurde, kasutades 2 ml 0,45 M boraatpuhvrit (pH=9,0), mille korral on glüfosaadi aminorühm deprotoneeritud ning reaktsioonivõimeline FMOC-Cl-ga. Seejärel lisati 140 µl 30 mg/ml FMOC-Cl lahust atsetonitriilis ja lasti proovil vähemalt kolm tundi reageerida. Mittepolaarse FMOC-rühma lisamine polaarsetele glüfosaadi molekulile võimaldab seda eraldada suurest hulgast maatriksi komponentidest kasutades pöördfaaskolonne ning parandab glüfosaadi IE ESI allikas.

Enne SPE padrunisse sisestamist, mida kasutati proovi puhastamiseks maatriksi komponentidest ja proovi kontsentreerimiseks, hapestati proov 1 ml sipelghappega (pH=2). See vähendab glüfosaat-FMOC molekuli polaarsust, protoneerides kaks kolmest happelisest rühmast (võrreldes pH=9) ning tõstab seega analüüdi seondumist pöördfaas SPE padruni C18 statsionaarse faasiga. SPE padrun konditsioneeriti enne proovi sisestamist 5 ml metanooli ja 5 ml 0,1% sipelghappe lahusega, et valmistada ette statsionaarne faas prooviga seondumiseks ja garanteerida padrunite puhtus (padrunid olid korduvkasutuses). Proov sisestati kiirusega umbes 1 ml/min ning pesti maatrikskomponentide vähendamiseks koheselt pärast proovi sisestamist 10 ml 0,1% sipelghappe lahusega. Pärast pesu kuivatati SPE padrunit 30 minutit, kasutades vaakumpumba poolt tekitatud õhu voolu, et vabaneda vee jääkidest padrunis. SPE padrunisse jäänud vesi võib kaasa tuua padrunisse sadenenud boraatpuhvri jääkide elueerumise koos glüfosaadiga ja proovi kokkuaurutamisel põhjustada glüfosaat-FMOC derivaadi lagunemise (vt. ptk. 3.3 Boraatpuhvri mõju). Pärast kuivatamist elueeriti proov SPE padrunist 9 ml metanooliga ning aurutati kuivaks N_2 voolus 50 °C juures. Kuivaksaurutatud proov lahustati 0,5 ml MilliQ vees ja süstiti HPLC/ESI/MS süsteemi.

Kuna glüfosaat-FMOC ja ^{13}C -glüfosaat-FMOC signaalide üheaegsel mõõtmisel ei olnud saadud tulemused kooskõlalised (vt. ptk. 3.7 MS parameetrid), süstiti ühte proovi kaks korda, mõõtes esimese jooksuga glüfosaat-FMOC ja AMPA-FMOC signaal ning teisega ^{13}C -glüfosaadi ja AMPA-FMOC signaal.

3. Tulemused ja arutelu

3.1 Määramismetoodika väljatöötamine

Töö eesmärgiks oli luua Tartu Ülikooli Katsekojas asuvat aparatuuri kasutades võimalikult kõrge tundlikkusega kvantitatiivne metoodika glüfosaadi ja tema põhilise laguprodukti AMPA määramiseks. Eesmärgi saavutamiseks koostati üldine skeem, mis põhines kirjandusele – valdavas enamuses tuginedes Hanke [35] ja Ibanez'i [13] gruppide töödele. Metoodika arendamist alustati MS parameetrite algse optimeerimisega negatiivses ESI režiimis ning glüfosaadi (siin ja edaspidi mõeldakse glüfosaadi all glüfosaat-FMOC derivaati) eraldamiseks vajaliku algse HPLC gradientprogrammi loomisega. Prooviettevalmistuse arendamist alustati, kasutades glüfosaadiga rikastatud MilliQ vett ilma sisestandardita, etapiviisiliselt ning prooviettevalmistusjärjekorrale vastupidiselt. Glüfosaadi jälgede analüüsiks vastuvõetava tundlikkusega prooviettevalmistusmetoodika valmimisel võeti kasutusele glüfosaadiga rikastatud Võrtsjärve vesikonna proovid, mille glüfosaadi sisaldus oli rikastamiseelselt alla avastamisiiri (LoD), mida kasutades optimeeriti analoogselt MilliQ veega metoodika tundlikkust ja täpsust mõjutavad etapid. Seejärel lisati prooviettevalmistusse sisestandardina ^{13}C -glüfosaat ja AMPA ning optimeeriti uuesti prooviettevalmistus, HPLC ja MS parameetrid.

Selles töös ei käsitleta: derivatiseerimiseks vajalikku FMOC-Cl hulga ja reaktsiooniaja optimeerimist; SPE proovi-, pesu- ja elueerimisruumalade optimeerimist; kokkuaurutamisparameetrite mõju saagisele; HPLC süsteemi ülekandeeffekti ning MS parameetrite optimeerimist negatiivses ESI režiimis, kuna need on varasemalt kirjeldatud [36].

3.2 Proovi kontsentreerimise mõju

Glüfosaadi madalate sisalduste tõttu looduslikus vees on vajalik proovi kontsentreerimine enne HPLC/ESI/MS analüüsi. Antud töös tehti seda kahes etapis – kasutades SPE koos saadud proovi kuivaksaurutamisega lämmastiku voolus. Analüüdi kontsentratsiooni tõstmiseks proovis antud metoodikaga on seega võimalik tõsta algset prooviruumala või vähendada kokkuaurutamise järgset proovi üles lahustamiseks kasutatavat solvendi ruumala. Kuna üleslahustamiseks kasutatav solvendi ruumala muutmine ei mõjuta prooviettevalmistuse keerukust ega ajakulu,

valiti selleks 500 µl, mis oli minimaalne ruumala kuivaksaurutamise anuma loputamiseks. Piisav kontsentreerimisastme ulatus, et saavutada nõutav LoD mõistliku ajakuluga, leiti seega optimeerides proovi algruumala.

ESI ionisatsiooniallika tundlikkuse tõttu ME suhtes ei pruugi proovi kontsentreerimisastme tõstmine, mingist kontsentreerimisastmest alates, enam märkimisväärselt madalamat LoD anda. Põhjus seisneb selles, et proovi kontsentreerimisega kaasneb mitte ainult analüüdi, vaid ka maatriksi komponentide sisalduse tõus. Nagu eelpool mainitud, saavad ME põhjustada ainult komponendid, mis elueeruvad kromatograafilisest kolonnist analüüdiga samal ajal. Retentsioonimehhanismide sarnasuse tõttu pöördfaas HPLC kolonni- ja pöördfaas SPE padruni statsionaarses faasis, on ME põhjustavatest komponentidest sellise SPE ja HPLC kombinatsiooniga vabanemine keeruline, kui mitte võimatu, kuna ained, mis elueeruvad analüüdiga samal ajal kromatograafilisest kolonnist seonduvad suure tõenäosusega ka SPE C18 faasiga. Probleemi saaks lahendada vahetades SPE või HPLC kolonni statsionaarset faasi. Näiteks vahetada pöördfaas SPE padrunid välja anioonvahetus padrunite vastu ning derivatiseerida proov pärast analüüdi SPE padrunist elueerimist. Sellist lahendust ei olnud aga praktikas võimalik rakendada, kuna derivatiseerimata glüfosaadi seondumine tugevate anioonvahetus SPE padrunitega ei andnud rahuldavaid tulemusi, mistõttu jäädki kirjanduses levinuima pöördfaas-pöördfaas lahenduse juurde ja optimeeriti kontsentreerimise ulatust.

Sobiliku kontsentreerimisastme leidmiseks uuriti glüfosaadiga rikastatud pinnavett, kasutades kahte prooviruumala – 10 ja 100 ml. Tulemused analüüsiti lähtuvalt protsessiefektiivsusest, mis on leitud proovikontsentratsiooni (isotoopmärgistatud standardiga korrigeerimata) suhe lisatud kontsentratsiooni.

Kuna protsessiefektiivsus hõlmab endas nii ME kui ka saagist, annab see parima hinnangu meetoodika tundlikkusele. Protsessiefektiivsuseks üle viie paralleeli saadi 10 ml prooviruumala korral glüfosaadi jaoks $34 \pm 4\%$ (\pm tähistab siin ja edaspidi standardhälvet) ja 100 ml korral $15 \pm 6\%$ ning AMPA jaoks vastavalt $92 \pm 29\%$ ja $31 \pm 15\%$. Madalam protsessiefektiivsus suuremal ruumalal tuleneb kõrgemast ME ning madalamast saagisest. Nimelt uhutakse suurel ruumalal glüfosaati juba proovisisestamise ajal märgatavalt rohkem välja (keskmise saagise vähenemine 0,35% 1 ml proovi kohta). See tähendab, et prooviruumala suurendamisel kümme korda, toimub ainult ligikaudu neljakordne tundlikkuse kasv. Analüüsi aeg pikeneb aga rohkem kui 10 korda,

kuna SPE padrunid kipuvad suuremal ruumalal kergesti ummistuma, isegi kasutades eelnevalt proovi filtreerimist. Samuti suureneb oht padruni täielikuks ummistumiseks, mis tekitab vajaduse proovi uuesti analüüsimiseks. Nendel kaalutlustel võeti kasutusele prooviruumala 25 ml, mille korral ei olnud padrunite ummistumise tõenäosus oluliselt suurem kui 10 ml korral.

3.3 Boraatpuhvri mõju

Metoodika arendamise algfaasis saadi anomaalselt madalaid saagiseid, mis ei olnud kooskõlas kirjanduses avaldatud tulemustega [10]. Probleemi lahendamise käigus, mis hõlmas endas igale metoodika etapile saagise hinnangu andmist, tuli välja, et suur ning vahel ka täielik analüüdi signaali kadumine toimub proovi kokkuaurutamise etapis. Erinevaid kokkuaurutamisparameetreid (temperatuur, kasutatava anuma materjal, lahuse koostis) muutes leiti, et glüfosaat-FMOC derivaadi lagunemine toimus kõrgetel boraatpuhvri kontsentratsioonidel.

Kokkuaurutamisprotsessi saagisele 0,015 M boraatpuhvri vesilahuses anti hinnang mitmel päeval. Antud kontsentratsioon valiti uurimiseks, kuna sellise kontsentratsiooni esinemist proovis peeti võimalikuks ilma padruni korraliku pesemiseta. Läbiviidud katsetes ei ületanud etapi saagis ühelgi kordusmõõtmisel 10% ning tihti toimus analüüdi signaali täielik kadumine. Kui aga sama boraatpuhvri kontsentratsiooniga lahuses läbi viidud kokkuaurutatud proov lahustati MilliQ vee asemel üles derivatiseerimislahuses, mis koosnes võrdsetest osadest MilliQ veest, 30 mg/ml FMOC-Cl MeCN lahusest ja 0,45 M boraatpuhvrist (pH=9,0), tõusis protsessi saagis kolmel paralleelil kuni 70%-ni. See näitab, et kõrge boraatpuhvri kontsentratsiooni mõjul kokkuaurutamisel lagunenu glüfosaat-FMOC derivaati saab uuesti derivatiseerida, kuid protsessi saagis on praktiliseks kasutamiseks liiga madal.

Kui kokkuaurutamise protsess viidi läbi $2,2 \cdot 10^{-5}$ M boraatpuhvri kontsentratsiooniga saadi etapi saagiseks $94 \pm 23\%$, mis näitab kokkuaurutamisele eelneva SPE padruni pesemise ja ka kuivatamise olulisust. Nimelt sadeneb osa boraati lahusest SPE etapis välja ja võib jääda padrunisse kinni, kus selle kristalle on enne 0,1% äädikhappega pesemist ka silmaga näha. Kuna boraat on vees raskesti lahustuv, ei ole seda 0,1% äädikhappega võimalik täielikult välja pesta ilma olulise analüüdi kaota. Seetõttu on oluline SPE padruni kuivatamine enne metanooliga

elueerimist, et vabaneda padrunisse jäänud veest. Vee jäägid padrunis tõstavad sinna jäänud boraadi lahustumist metanoolis ja SPE padrunist prooviga koos elueerunud boraadi hulk on seega suurem.

Samuti leiti, et kõrge boraatpuhvri kontsentratsioon süstitavas lahuses vähendab glüfosaadi, aga mitte AMPA retentsioonიაega. Glüfosaadi retentsiooniajad nihkusid 6,1 minutilt 5,5 minutile, kui kuivatatud proov lahustati MilliQ vee asemel üles 0,225 M boraatpuhvri lahuses. AMPA t_R konstantsus välistab põhjusena süstitava proovi kõrgema pH boraatpuhvri lahuses retentsiooniaja nihke põhjusena. Kõrgemal pH-l karboksüülhappe ja $-PO_3H_2$ rühm dissotseeruvad ja retentsioon mittepolaarse statsionaarse faasiga nõrgeneb. Esmapilgul võib küll tunduda, et juhul kui lahuse pH oleks pärast kokkuaurutamist vahemikus $\sim pH=1-2$ (mis tundub vähe tõenäoline) ja pärast boraatpuhvri lisamist tõuseks see vahemikku $\sim pH=3-5$, oleks mõjutatud ainult glüfosaadis olev karboksüülrühm ($pK_a=2,29$), aga kui arvestada fakti, et standardlahustes, mille $pH>7$, on glüfosaadi t_R sama, mis vees lahustatud kokkuaurutamisjäägil, ei näi tõusva pH seletus piisav. Tõenäoliselt on t_R muutus põhjustatud boraadi ja glüfosaadi vahel toimuvast spetsiifilisest interaktsioonist, mis ei toimu AMPA-ga.

Tihti ei ole otstarbekas või võimalik glüfosaati derivatiseeritud kujul osta (peamiselt selle ühendi ebastabiilsuse tõttu), seega derivatiseeritakse analüüt FMOC-Cl ja boraatpuhvrit kasutades ka standardlahuste jaoks ise. Valmistamise juures on oluline silmas pidada, et standarditesse ei jäetaks oluliselt kõrgemat boraatpuhvri sisaldust kui proovides, mis on pärast kokkuaurutamist MilliQ vees lahustatud. Kõrge boraatpuhvri sisaldusega standardid võivad endaga kaasa tuua mitmeid probleeme. Esiteks on glüfosaadi madalate sisalduste tõttu loodusliku vee analüüsil saadud analüüdi piigid väga väikesed ja võivad jääda interpreteerimata, kui eeldatakse, et proovi piik omab kalibreerimisstandardiga sama t_R . Teiseks oleme looduslikke proove analüüsides kohanud maatriksi piike, mis omavad glüfosaadile iseloomulikku üleminekut (m/z 392 \rightarrow m/z 170), kuid mille retentsiooniaeg on glüfosaadi piigist pisut erinev. Selliste piikide esinemisel võib ainult ühte fragmendi piiki jälgides tekkida segadus piigi päritolu kohta ja tekkida valepositiivse tulemuse oht. Probleemi lahendamiseks tuleks registreerida igale piigile täielik MS^2 spekter, millest saab näha, kas selle kuju on glüfosaadile iseloomulik. Teiseks võimaluseks on jälgida fragmenti m/z 170 asemel fragmenti m/z 88 nagu on soovitatud Ibanezi poolt [13]. Kuna fragmendi piik m/z 170 andis töös kasutatud ionilõks massispektromeetriga kõrgema

tundlikkuse ja igal analüüsil registreeriti täielik spekter, otsustati metoodika tundlikkuse tõstmiseks monitoorida fragmendi m/z 170.

Kuna naatriumboraat on mittelenduv ja toob kaasa MS sisendi määrdumise valge sademega, uuriti, millist mõju avaldab selle sisaldus IE. Keskmise kalibreerimisgraafiku (6 punktiga) tõusudest arvatud ME oli 0,225 M boraatpuhvri kontsentratsioonil 71% glüfosaadi ja 54% AMPA jaoks. Kuna analüüsil kasutatakse ^{13}C märgistatud glüfosaati sisestandardina, ei mõjuta see analüüsi täpsust glüfosaadi jaoks, kuid vähendab metoodika tundlikkust.

3.4 ^{13}C -glüfosaadi poolt põhjustatud ME

Proovi kontsentreerimise mõju hindamisel ME-le leiti, et identselt valmistatud proovide glüfosaadi ja ^{13}C -glüfosaadi MS-signaalide suhe võib proovist proovi olla väga erinev, kui neid on erineval määral kontsentreeritud. Nähtust edasi uurides leiti, et ^{13}C -glüfosaat vähendab glüfosaadi signaali ja kuna mahasurumine näis olevat sõltuvuses ^{13}C -glüfosaadi kontsentratsioonist, uuriti eksperimentaalsete tulemuste sobilikkust C. G. Enke poolt välja töötatud mudeliga [19]. Vastupidine, glüfosaadi mõju ^{13}C -glüfosaadile, jäeti uurimata, kuna ei ole täheldatud, et glüfosaadi kontsentratsioonid looduslikus vees küündiksid tasemini, milles võiks eeldada sellise mehhanismiga ME esinemist.

ESI kasutades tekitatakse tilkasid, millel on sõltuvalt kasutatavast režiimist kas positiivsete või negatiivsete laengute liig. Kuna ühemärgilised laengud tõukuvad, on üleliigset laengut tekitavad osakesed eelistatult tilga pinna lähedases kihis. Enke pakkus välja, et lahuse koostise ja ionide suhtelised signaalid massispektris sõltuvad sellest, kuidas ionid jagunevad ESI tilga sise- ja pindfaasi vahel. Sisefaas on summaarselt neutraalne, kus asuvad neutraalsed osakesed ja ionipaarid, ning pindfaas on laetud ja seal asub tilga laengut määrav laetud osakeste liig. Enke pakkus välja, et suhtelised signaalide tugevused massispektris sõltuvad ionide suhtelisest sisaldusest tilga pinnafaasis. Nendel põhimõtetel välja töötatud mudeliga näitas ta kuidas ühelaengulise analüüdi signaal sõltub analüütilisest kontsentratsioonist, afiinsusest tilga pinnale ja konkureeriva (antud kontekstis ME põhjustava) aine analüütilisest kontsentratsioonist ning afiinsusest tilga pinnale. Antud töös esilekerkinud olukorra kirjeldamiseks avaldati mudel

(algselt Valem 3 kujul) kujul, millega saaks ennustada analüüdi signaali, kui ME põhjustava aine analüütilist kontsentratsiooni varieerida.

Et avaldada Enke mudel kujul, millega saaks ennustada glüfosaadi signaali sõltuvust ^{13}C -glüfosaadi kontsentratsioonist, peame esiteks avaldama pindkontsentratsiooni liia $[Q]$, mida iga ESI allikas tekkinud tilk omab:

$$[Q] = [A^+]_s + [B^+]_s + [E^+]_s, \quad (4)$$

Kus $[A^+]_s$, $[B^+]_s$ ja $[E^+]_s$ on vastavalt analüüdi, segaja ja elektrolüüdi kontsentratsioonid tilga pindfaasis. Glüfosaadi ja ^{13}C -glüfosaadi keemilise ja füüsikalise sarnasuse tõttu eeldame, et afiinsused tilga pinnale, mida väljendame tilga sise- ja välisfaasivahelise jaotuskoefitsendiga K , on võrdsed ($K_A=K_E$).

Seega saame analüüdi ja segaja pindkontsentratsioonide liiad tilga pinnal defineerida analüütiliste kontsentratsioonide ja pindafiinsuste kaudu

$$[A^+]_s = \frac{C_A K_A}{C_E K_E} [E^+]_s, \quad (5)$$

$$[B^+]_s = \frac{C_B K_A}{C_E K_E} [E^+]_s, \quad (6)$$

kus C_A , C_B ja C_E on vastavalt analüüdi, segaja ja elektrolüüdi analüütilised kontsentratsioonid.

Valemist 5 saab avaldada pindkontsentratsiooni liia ka elektrolüüdi jaoks kui

$$[E^+]_s = [A^+]_s \frac{C_E K_E}{C_A K_A}. \quad (7)$$

Kombineerides valemid 6 ja 7 saame avaldada $[B^+]_s$ kui

$$[B^+]_s = \frac{C_B}{C_A} [A^+]_s. \quad (8)$$

Avaldades $[A^+]_s$ kasutades valemeid 4 ja 5 kui

$$[A^+]_s = \frac{C_A K_A}{C_E K_E} ([Q] - [A^+]_s - [B^+]_s), \quad (9)$$

saame valemi 9 avaldada kasutades valemit 8 kui

$$[A^+]_s = \frac{C_A K_A}{C_E K_E} ([Q] - [A^+]_s - \frac{C_B}{C_A} [A^+]_s), \quad (10)$$

millest sulge avades ja ümber grupeerides saame:

$$\begin{aligned} [A^+]_s &= \frac{C_A K_A}{C_E K_E} [Q] - \frac{C_A K_A}{C_E K_E} [A^+]_s - \frac{C_B K_A}{C_E K_E} [A^+]_s \\ [A^+]_s \left(1 + \frac{C_A K_A}{C_E K_E} + \frac{C_B K_A}{C_E K_E} \right) &= \frac{C_A K_A}{C_E K_E} [Q] \\ [A^+]_s &= \frac{\frac{C_A K_A}{C_E K_E}}{1 + \frac{C_A K_A}{C_E K_E} + \frac{C_B K_A}{C_E K_E}} [Q] \\ [A^+]_s &= \frac{C_A K_A}{C_E K_E + C_A K_A + C_B K_A} [Q], \end{aligned} \quad (11)$$

mida võib avaldada kui

$$[A^+]_s = \frac{k_1}{k_2 + C_B}, \quad (12)$$

kus

$$k_1 = C_A [Q]$$

ja

$$k_2 = \frac{C_E K_E + C_A K_A}{K_A},$$

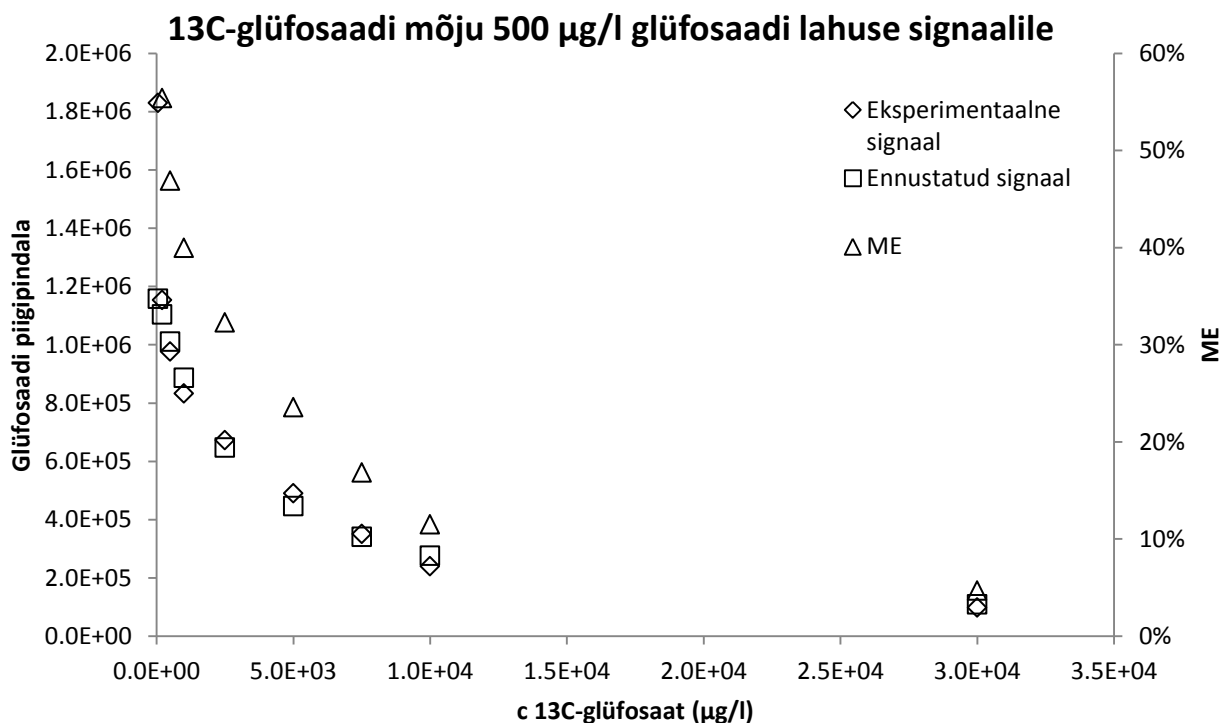
millest on näha, et $[A^+]_s$ ja seega ka analüüdi signaal väheneb C_B kasvamisel.

Eksperimentaalsetele mõõtmistulemustele, milles glüfosaadi kontsentratsiooni hoiti 500 µg/l juures ja ^{13}C -glüfosaadi kontsentratsiooni muudeti 0 ja 30 mg/l vahel, lähendamisel avaldatud mudelile on näha (Joonis 1), et glüfosaadi signaal on pöördvõrdelises seoses ^{13}C -glüfosaadi signaalist, just nagu Enke mudel seda ennustab. Kokkulangevust Enke mudeli ja eksperimentaalsete tulemuste vahel hinnati kasutades valemit 13:

$$S_{\text{kokkulangevus}} = \sqrt{\sum_{n=1}^n \frac{(\frac{s_{\text{eksp}} - s_{\text{ennustatud}}}{s_{\text{eksp}}})^2}{n-1}}, \quad (13)$$

milles S_{eksp} ja $S_{\text{ennustatud}}$ on vastavalt eksperimentaalselt mõõdetud ja Enke mudeli poolt ennustatud pindalad ühel kontsentratsioonil ning n on mõõdetud punktide arv. Kokkulangevusparameetriks saadi valemit 13 kasutades $S_{\text{kokkulangevus}}=8,1\%$.

Joonis 1 500 µg/l glüfosaadi signaali sõltuvus ^{13}C -glüfosaadi kontsentratsioonist



Nagu Jooniselt 1 näha, langeb glüfosaadi signaal, kui tõsta sisestandardi kontsentratsiooni. Selle nähtuse tõttu tuleb määramismetoodikas kasutada võimalikult väikest sisestandardi kontsentratsiooni, et hoida sellest tulenev ME minimaalsena, kuid piisavalt suur, et tagada hea korduvus.

3.5 Kromatograafilise gradiendi kiiruse mõju ME ja LoD

Kiireima kromatograafilise lahutuse saavutamine on üks tähtsamaid määramismetoodika arendamise etappe, kuna omab väga suurt mõju tulevikus vajaminevale analüüsi ajale ning kromatograafilistele kuluvahenditele. Samas tuleb arvestada ka meetodika headuse parameetreid nagu LoD ja ME, mis võivad kiireima võimaliku kromatograafilise programmi korral olla

vastuvõetamatute väärtustega. Seetõttu uuriti antud töös kromatograafilise gradiendi kiiruse mõju ME ja LoD võrreldes kahte gradienti – *kiiret* ja *aeglast*, mis on toodud Tabelis 4.

Tabel 4 Töös võrreldud gradiendid

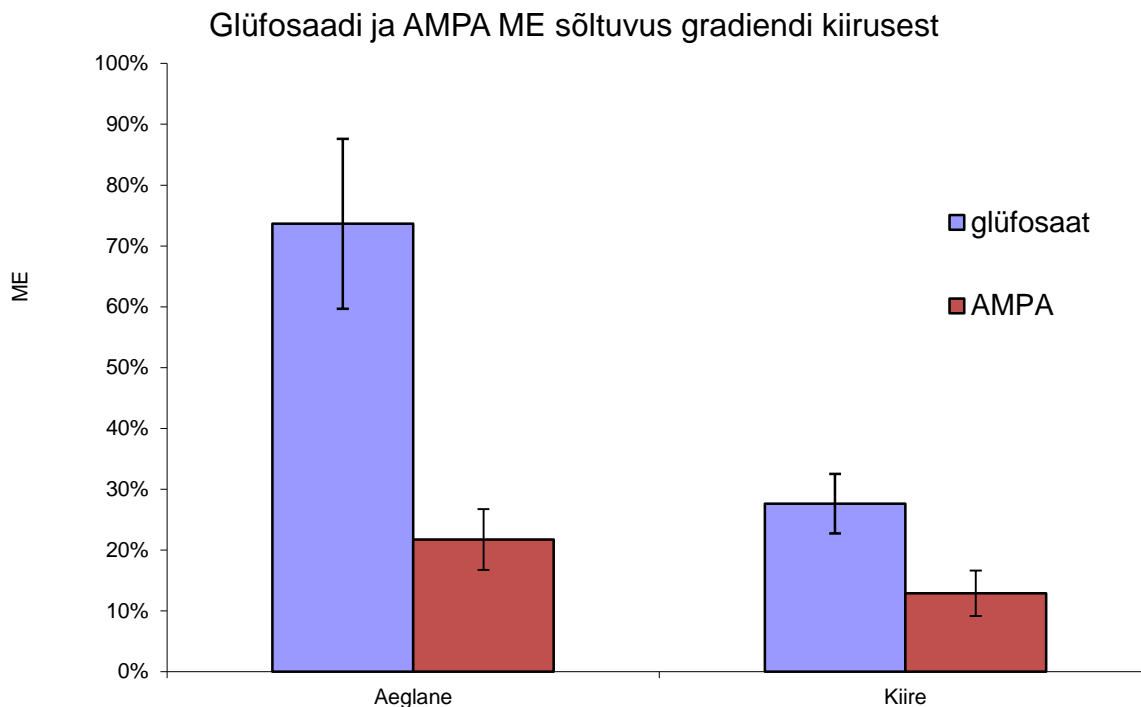
<i>Aeglane gradient</i>		<i>Kiire gradient</i>	
min	%MeCN	min	%MeCN
0	20	0	20
15	100	10	100
20	100	13	100
22	20	15	20

Piigi pindaladel põhinev hinnang meetodika tundlikkusele andis standardeid kasutades mõlema gradiendiga võrreldavad tulemused. *Kiiret* gradienti kasutades olid piigid kitsamad, mis viitab sellele, et suure tõenäosusega annab *kiire* gradient standardeid kasutades madalama LoD.

ME uuring, kus kasutati ekstraktsiooni järgselt neljal kontsentratsioonil (2, 5, 10 ja 20 µg/l) rikastatud proove, näitas aga *aeglase* gradiendi eelist *kiire* ees. Nagu Jooniselt 2 näha, oli *aeglase* gradiendi korral keskmine ME glüfosaadi jaoks $74\% \pm 14\%$ (n=5) ja AMPA jaoks $22\% \pm 5\%$ (n=5). *Kiire* gradiendi korral jäid mõlema analüüdi kaks madalamat kontsentratsiooni alla määramispiiri ja keskmised ME üle kahe kõrgema kontsentratsiooni olid glüfosaadi ja AMPA jaoks vastavalt $25\% \pm 10\%$ ja $13\% \pm 4\%$. Nendest tulemustest on selgelt näha, et madalam ME *aeglase* gradiendi korral kaalub üle kitsamad piigid *kiire* gradiendi korral.

Antud nähtust, kus *aeglasem* gradient annab madalama ME kui *kiire*, võib seletada analüüdi parema lahutuvusega maatriksi komponentidest. Mida *aeglasem* on gradiendi elueeriva jõu kasv, seda väiksem on samal ajal elueeruvate komponentide arv ja seega ka tõenäosus signaali mahasurumiseks maatriksi komponentide poolt. Kuna antud meetodika eesmärgiks on glüfosaadi jälgede määramine, tuleb saavutada võimalikult madal LoD ning seetõttu valiti lõplikusse meetoodikasse *aeglane* gradient.

Joonis 2 ME sõltuvus kromatograafilisest gradiendist



3.6 Mobiilfaasi puhverlahuse kontsentratsiooni ja pH mõju

Kirjanduses avaldatud metoodikates on glüfosaadi määramisel kasutatud pöördfaaskolonnides nõrgema elueeriva komponendina erineva pH ja kontsentratsiooniga puhverlahuseid [10]. Kuna kromatograaferimiseks optimaalsed tingimused võivad sõltuda nii kolonnist kui ka proovi maatriksist, otsustati kasutatava kolonni ja uuritavate proovide jaoks optimaalse piigi kuju, minimaalse ME ja madalaima võimaliku LoD saavutamiseks optimeerida mobiilfaasi pH ja puhvri kontsentratsiooni kolmes etapis, kasutades standardlahuseid ja analüüdiga rikastatud looduslikke proove (milles esialgne glüfosaadi sisaldus oli alla LoD). Kuna AMPA andis glüfosaadist märgatavalt kitsamaid kromatograafilisi piike ja kõrgema tundlikkuse MS-detektoris, peeti optimaalsete tingimuste valikul silmas esmajärgus optimaalseid tingimusi glüfosaadi määramiseks (Joonis 3).

Alustuseks võrreldi 5 mM ammooniumatsetaadi puhvreid pH = 2,8; 5,0 ja 8,0. Puhverlahus pH=2,8 andis väga laiad piigid, mis alandavad metoodika LoD, pH = 8,0 andis lõhestunud piike

(mis võib tuleneda sellest, et süstimisel kasutatud standardlahus oli valmistatud MilliQ vees, mitte eluendis) ning pH=5,0 andis kitsad sümmetrilised piigid.

Järgmisena optimeeriti parima tulemuse andnud pH=5,0 lahuse ammooniumatsetaadi kontsentratsiooni kasutades 1, 5 ja 10 mM puhverlahuseid. Kalibreerimisgraafiku tõusu põhjal andis glüfosaadi standardlahuste jaoks kõrgeima tundlikkuse 10 mM puhver (Joonis 3), aga looduslike rikastatud proovide jaoks 5 mM puhver. Joonisel 3 toodud skaleeritud tundlikkused arvutati omistades kõige kõrgemale omavahelises võrdluses olnud kalibreerimisgraafiku tõusule (proovid ja standardid eraldi) väärtuseks 100% ning esitades madalamad võrdluses olnud kalibreerimisgraafiku tõusud protsentuaalselt võrreldes kõrgeima tõusuga. Kalibreerimisgraafiku põhjal arvutatud ME olid 5 ja 10 mM lahuste jaoks vastavalt 69% ja 23%. 1 mM kontsentratsiooniga puhverlahust kasutades ei olnud standardites ega rikastatud proovides, mille maksimaalsed sisaldused olid 50 µg/l, glüfosaadi piike näha. Samas andis 1 mM puhver kalibreerimisgraafiku tõusust arvutatuna parimad tundlikkused AMPA jaoks nii standardites kui ka rikastatud proovides. Kalibreerimisgraafiku tõusust arvutatud ME oli 1, 5 ja 10 mM lahustes AMPA jaoks vastavalt 34%, 21% ja 14%. Et tagada vastuvõetavad tulemused mõlema analüüdi jaoks, valiti edasiseks optimeerimiseks 5 mM puhver.

Viimases etapis läbi viidud optimeerimisel kasutati 5 mM lahuseid pH = 4,0; 5,0 ja 6,0, et optimeerida esimeses etapis leitud parima tulemuse andnud lahuse pH täpsemalt. Puhvrid pH = 5,0 ja 6,0 andsid standardlahuseid kasutades glüfosaadi jaoks võrreldavaid tulemusi, kuid rikastatud proovide korral andis pH = 5,0 parima tundlikkuse ja madalaima ME. ME oli glüfosaadi jaoks pH = 4,0, 5,0 ja 6,0 korral vastavalt 32%, 42% ja 11%. AMPA korral andsid standardid ja rikastatud proovid võrreldavaid tulemusi kõikidel kontsentratsioonidel. Nagu Jooniselt 3 näha, võib ME samadel tingimustel glüfosaadi jaoks märgatavalt erineda, mis tuleneb MS halvast päevadevahelisest korduvusest.

Joonis 3 Puhverlahuse optimeerimise järjestikkused etapid

	pH=2,8 c=5 mM	pH=5,0 c=5 mM	pH=8,0 c=5 mM
<i>Glüfosaadi piigi kuju</i>	Lai	Kitsas	Kaheks lõhestunud
<i>Glüfosaadi t_R</i>	11,4 min	6,6 min	3,2/4,2 min

↓

	pH=5,0 c=1 mM	pH=5,0 c=5 mM	pH=5,0 c=10 mM
<i>Skaleeritud glüfosaadi tundlikkus</i>	Proov 0% Standard 0%	Proov 100% Standard 66%	Proov 51% Standard 100%
<i>Glüfosaadi ME</i>	Piigid puudusid	69%	23%
<i>Glüfosaadi t_R</i>	-	6,1 min	6,3 min
<i>Skaleeritud AMPA tundlikkus</i>	Proov 100% Standard 100%	Proov 38% Standard 62%	Proov 33% Standard 82%
<i>AMPA ME</i>	32%	21%	14%
<i>AMPA t_R</i>	6,5 min	7,4 min	7,7 min

↓

	pH=4,0 c=5 mM	pH=5,0 c=5 mM	pH=6,0 c=5 mM
<i>Skaleeritud glüfosaadi tundlikkus</i>	Proov 39% Standard 50%	Proov 100% Standard 99%	Proov 28% Standard 100%
<i>Glüfosaadi ME</i>	32%	42%	11%
<i>Glüfosaadi t_R</i>	7,2 min	6,1 min	4,2 min
<i>Skaleeritud AMPA tundlikkus</i>	Proov 41% Standard 54%	Proov 67% Standard 63%	Proov 100% Standard 100%
<i>AMPA ME</i>	16%	22%	21%
<i>AMPA t_R</i>	8,0 min	7,4 min	6,7 min

3.7 MS parameetrid

Kirjanduses on näidatud, et reeglina näitab ESI negatiivses režiimis väiksemat ionisatsiooni mahasurumist kui positiivses [20]. Samas on ka näidatud, et glüfosaadi jaoks on positiivse ESI korral tundlikkus kaks korda suurem kui negatiivses [13]. Töös leiti, et kasutatavaioonlõks massispektromeetriga ei ole negatiivses režiimis võimalik glüfosaadi jälgi määrata, kasutades sisestandardina 1 Da erinevusega isotoopmärgistatud glüfosaati. Põhjus seisneb selles, et vähendades negatiivses režiimis MS isoleerimisvahemikku alla 4 Da (teoreetiliselt on 1 Da erinevusega sisestandardit kasutades maksimaalne isoleerimisvahemik 2 Da, sõltudes täpsemalt instrumendi lahutusvõimest, massitelje kalibreerimisest ning massitelje kalibreerimise püsimisest), tõusis süstitava lahuse LoD negatiivses ESI režiimis, kasutades standardlahuseid, kus ME ei esine, üle 20 µg/l süstitavas lahuses, mis on liiga kõrge jälgede määramiseks. Seetõttu vahetati algselt kasutatud negatiivne režiim positiivse vastu, mille korral tundlikuse vähenemine isoleerimisvahemiku kitsendamisel ei olnud nii suur, kasutades standardlahuseid, kuni isoleerimisvahemikuni 1,5 Da.

Sobival sisestandardi kasutamisel peaks selle signaal käituma analoogselt analüüdi signaaliga, kui nende kontsentratsioonide suhe on eksperimendist-eksperimenti konstantne ning intensiivsused on mõjutatud välistest parameetritest nagu instrumendi korduvus, ME, saagis vms. Selle kontrollimiseks valmistati ühes proovimaatriksis viis sama glüfosaadi ja sisestandardi kontsentratsiooniga proovi ning korreleeriti omavahel glüfosaadi ja ^{13}C -glüfosaadi signaale. 1 Da laiematel isoleerimisvahemikel esines *crosstalk* efekt, mille tõttu puudus ^{13}C -glüfosaadi ja glüfosaadi signaalide vahel korrelatsioon (glüfosaadi ja ^{13}C -glüfosaadi korreleeruvus $R^2 = 0,01$). *Crosstalk* efekt vähenes kui isoleerimisvahemik viidi 0,8 Da ($R^2 = 0,82$), kuid siis tõusis LoD süstitavas lahuses üle 50 µg/l.

Ioonlõks massispektromeeter töötab tsüklikena, kus vaheldumisi isoleeritakse ja fragmenteeritakse erineva m/z -ga uuritavaid ioone. Iga tsükkel kogub lõksu kindla m/z ioone ning kõik lõksu jäänud osakesed annavad tsükli lõpus elektronkordistis signaali. Signaali võivad anda ka isoleeritavast erineva m/z ioonid, kui nad on mingil põhjusel lõksu jäänud ning annavad fragmenteerumisel sama m/z -ga fragmendi.

Üheks *crosstalki* põhjuseks peeti võimalust, etioonlõks ei puhastu enne uue tsükli algust eelmises tsükli mõõdetud ioonidest, kuna puhastumisaeg on liiga lühike, ja lõksu jäänud

osakesed annavad signaali uues tsüklis [37]. Väljaselgitamiseks, kas tegu võib olla probleemi allikaga, prooviti tsüklite vahelist puhastusaega suurendada. Kuna kasutatava Agilent LC/MSD Trap XCT instrumendil on võimalik muuta ainult tsükli pikkust, aga mitte tsüklite vahelist aega, lisati glüfosaadi ja ^{13}C -glüfosaadi tsüklite vahele *dummy* üleminekud, mis on fiktiivsed üleminekud, kus isoleeritakse ja fragmenteeritakse proovis puuduva m/z -ga ioone, eesmärgiga puhastada ioonlõksu. *Dummy* ülemineku isoleeritavaks m/z valiti 400, mis ei andnud glüfosaadile ega ^{13}C -glüfosaadile iseloomulikke fragmentioone. Nii ühe kui ka kahe *Dummy* ülemineku lisamine ei vähendanud *crosstalki*, mis näitab, et *crosstalk* ei ole põhjustatud ioonlõksu ebapiisavast puhastumisest.

Ainuke leitud võimalus *crosstalk* efekti vähendamiseks oli analüüsida uuritavat lahust kaks korda ja registreerides ühel jooksul ainult glüfosaadi ning teisel ^{13}C -glüfosaadi signaal. Sellisel kombinatsioonil oli glüfosaadi ja sisestandardi signaalide vaheline korreleeruvus looduslikus rikastatud vees $R^2 = 0,93$ ja LoD süstitavas lahuses 2 $\mu\text{g/l}$. Sellisel lähenemisel võtab sisestandard arvesse prooviettevalmistusest tulenevad kaod ja ME, kuid ei arvesta süstisuurusest tulenevat ebatäpsuse, mis automaatset proovisisestus süsteemi kasutades ei ole väga suur.

3.8 Metoodika valideerimine

Pinnavesi tundub esmapilgul suhteliselt lihtne maatriks, mida analüüsida. Kui aga analüüdi sisaldus proovis on väga madal, ning sellest tulenevalt on vajalik teostada ulatuslik proovikontsentreerimine, võib algselt lihtne maatriks muutuda oluliselt keerulisemaks. Tihti tuleneb see sellest, et proovi kontsentreerides on keeruline vabaneda analüüdiga sarnastest komponentidest, mis elueeruvad kromatograafilisest kolonnist analüüdiga samal ajal ja põhjustavad ME.

Metoodika protsessiefektiivsuse kõrge varieeruvuse tõttu ei olnud määramis- ega avastamispiiride paika panemine tavapärase meetoditega, mis kasutavad S/N väärtusi, võimalik. Arvestades ^{13}C -glüfosaadi signaalidest saadud hinnangut protsessiefektiivsusele, valiti glüfosaadi ja AMPA määramispiirid sellised, et ka madalaima protsessiefektiivsusega proovis oleks antud kontsentratsioonidel analüüdid detekteeritavad. Kuna antud lähenemisega on keeruline

adekvaatselt LoD hinnata, otsustati määrata ainult LoQ, mis saadi glüfosaadile 0,2 µg/l ning AMPA 0,02 µg/l uuritavas vees.

Sertifitseeritud referentsaine puudumise tõttu viidi metoodika tõesuse hindamine läbi kasutades looduslikku vett, mille glüfosaadi sisaldus ei ületanud LoD. Antud proovi rikastati kahel kontsentratsioonil (0,2 ja 1 µg/l), mille kõrval uuriti ka kahte rikastamata proovi. Keskmiseks tõesuseks, kasutades ¹³C-glüfosaadiga korreleerimist, saadi 79 ± 20% (n=6) ning rikastamata proovid ei andnud valepositiivseid tulemusi. AMPA isotoopmärgistatud standardi puudumise tõttu ei hinnatud metoodika tõesust AMPA määramisel. Sellel põhjusel tuleks Võrtsjärve vesikonna proovides antud AMPA sisaldustesse suhtuda kriitiliselt.

Keskmine protsessieffektiivsus, mis arvutati kasutades ¹³C-glüfosaadi signaale uuritud Võrtsjärve vesikonna proovides, oli 28 ± 5% (n=39). Metoodika korduvuseks ühes proovis saadi 15% (n=5).

3.9 Glüfosaadi sisaldused Võrtsjärves

Antud töö raames määrati glüfosaadi ja AMPA sisaldused Võrtsjärves, viies Võrtsjärve vesikonnas asuvas jões (Väike Emajõgi, Suur Emajõgi, Ohne, Tarvastu ja Tänassilma) ning kahes haritava põllu äärses piirikraavis (Kobilu (kahes erinevas kohas) ja Konguta) (Joonis 4). Võrtsjärves ja seda ümbritsevas jõgedes viidi monitooring läbi vahemikus mai 2011 kuni mai 2012 ja piirikraavides vahemikus mai 2011 kuni november 2012.

Glüfosaadi sisaldus ületas kõikides proovivõtu kohtades vähemalt ühel kuul LoQ nii glüfosaadi kui ka AMPA jaoks, mis olid vastavalt 0,2 µg/l ja 0,02 µg/l (Tabelid 5 ja 6). Võrtsjärves ületas glüfosaadi sisaldus määramispiiri ühel korral (0,3 µg/l augustis 2011) ning AMPA sisaldus neljal korral (kõrgeim 0,63 µg/l augustis 2011). Jõgedest võetud proovides oli suurim glüfosaadi sisaldus Suures Emajões (3,4 µg/l juunis 2011), millest leiti kuu aega hiljem kõrgeim AMPA sisaldus uuritud jõgedes (0,69 µg/l juulis 2011). Piirikraavides oli nii LoD ületavate proovide tihedus kui ka kõrgeimad sisaldused suuremad kui jõgedes (Tabel 6). Kõrgeim glüfosaadi sisaldus leiti Kobilu piirikraavist (5,0 µg/l oktoobris 2011) ja kõrgeim AMPA sisaldus Konguta piirikraavist (0,36 µg/l mais 2012).

Tabel 5 Glüfosaadi ja AMPA sisaldused Võrtsjärves ja sinna suubuvates või sealt lähtuvates jõgedes

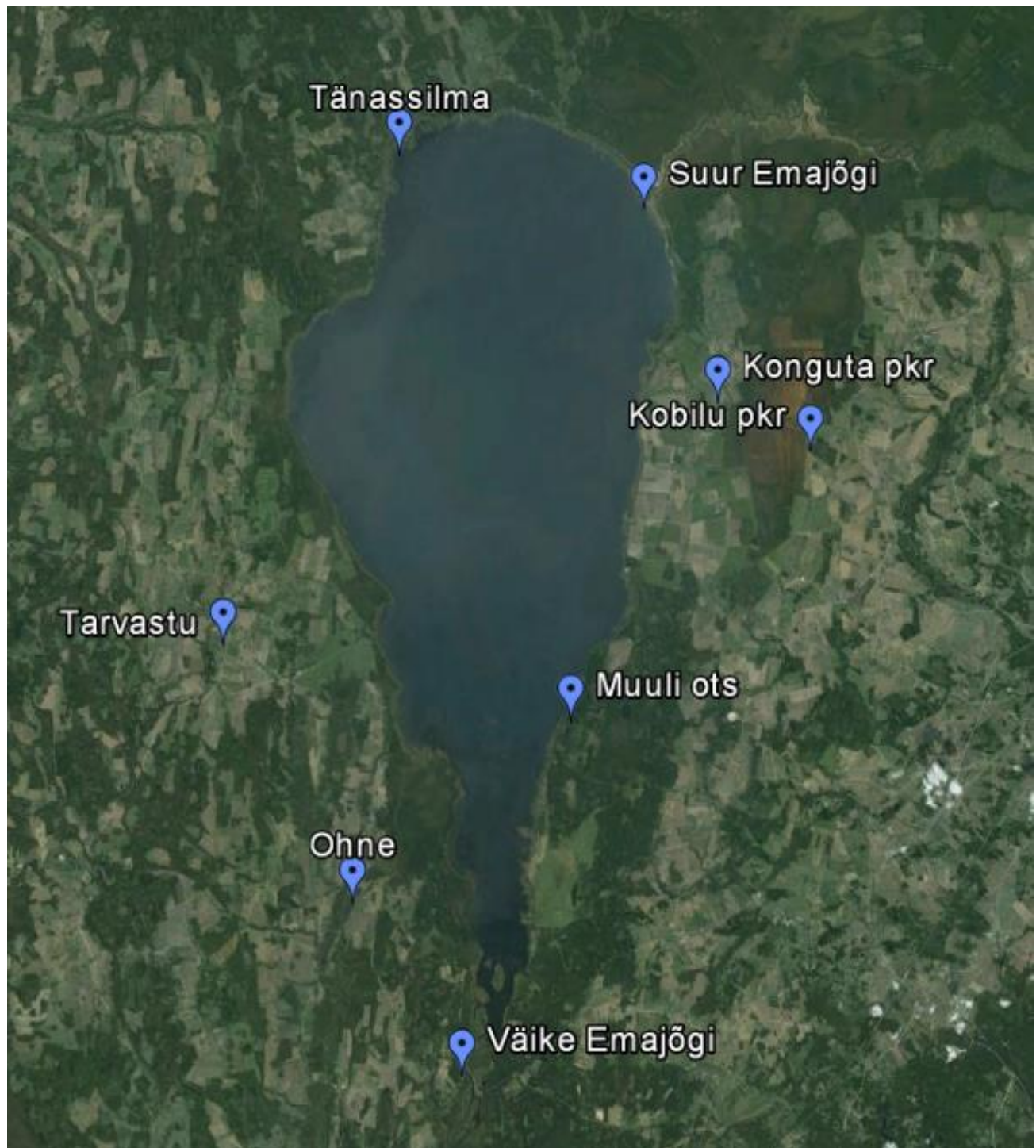
Proovivõtu aeg	Väike Emajõgi		Ohne		Tarvastu	
	Glüfosaat	AMPA	Glüfosaat	AMPA	Glüfosaat	AMPA
mai 2011	<0,2	<0,02	<0,2	<0,02	<0,2	<0,02
juuni 2011	<0,2	0,10	<0,2	<0,02	<0,2	<0,02
juuli 2011	<0,2	0,10	<0,2	<0,02	<0,2	<0,02
august 2011	<0,2	<0,02	<0,2	<0,02	<0,2	<0,02
september 2011	<0,2	<0,02	<0,2	0,02	<0,2	0,04
oktoober 2011	<0,2	0,03	<0,2	0,04	<0,2	<0,02
november 2011	<0,2	0,02	<0,2	0,03	<0,2	0,03
detsember 2011	<0,2	0,02	<0,2	0,06	<0,2	0,02
jaanuar 2012	<0,2	<0,02	<0,2	<0,02	<0,2	0,03
veebruar 2012	<0,2	<0,02	<0,2	<0,02	<0,2	<0,02
märts 2012	<0,2	<0,02	<0,2	0,05	<0,2	<0,02
aprill 2012	0,3	0,53	0,2	0,49	0,3	0,39
mai 2012	0,2	0,39	0,2	0,25	0,2	0,28
Proovivõtu aeg	Tänassilma		Suur Emajõgi		Võrtsjärv	
	Glüfosaat	AMPA	Glüfosaat	AMPA	Glüfosaat	AMPA
mai 2011	<0,2	<0,02	<0,2	<0,02	<0,2	<0,02
juuni 2011	<0,2	0,14	3,4	0,05	<0,2	0,13
juuli 2011	0,2	0,65	0,3	0,69	<0,2	<0,02
august 2011	<0,2	<0,02	<0,2	<0,02	0,3	0,63
september 2011	<0,2	<0,02	<0,2	0,05	<0,2	<0,02
oktoober 2011	<0,2	<0,02	<0,2	<0,02	<0,2	<0,02
november 2011	<0,2	<0,02	<0,2	0,04	<0,2	<0,02
detsember 2011	<0,2	0,03	<0,2	<0,02	<0,2	<0,02
jaanuar 2012	<0,2	<0,02	<0,2	0,03	<0,2	<0,02
veebruar 2012	<0,2	<0,02	<0,2	<0,02	<0,2	<0,02
märts 2012	0,3	0,38	<0,2	0,55	<0,2	<0,02
aprill 2012	0,3	0,39	<0,2	0,38	<0,2	0,42
mai 2012	<0,2	0,25	<0,2	0,36	<0,2	0,27

Tabel 6 Glüfosaadi ja AMPA sisaldused Võrtsjärve lähedastes piirikraavides. Kuudel, mil võeti proove mitmel nädalal on nädal lisatud sulgudesse.

Proovivõtu aeg	Konguta pkr		Kobilu pkr			
	Glüfosaat	AMPA	Glüfosaat	AMPA		
mai 2011	<0,2	<0,02	<0,2	<0,02		
juuni 2011	<0,2	0,08	<0,2	<0,02		
juuli 2011	0,2	0,08	<0,2	<0,02		
august 2011	<0,2	<0,02	<0,2	<0,02		
september 2011	<0,2	0,04	0,8	0,08		
oktoober 2011	<0,2	<0,02	5,0	0,04		
november 2011	<0,2	<0,02	0,2	0,09		
detsember 2011	<0,2	<0,02	0,2	0,02		
jaanuar 2012	<0,2	0,04	<0,2	<0,02		
veebruar 2012	<0,2	0,03	<0,2	<0,02		
märts 2012	0,2	0,33	<0,2	<0,02		
aprill 2012	<0,2	0,31	0,2	0,29	Kobilu pkr 2	
mai 2012	0,4	0,36	<0,2	0,34	Glüfosaat	AMPA
september (1) 2012	0,2	0,09	<0,2	0,11	<0,2	0,05
september (2) 2012	0,2	0,07	<0,2	0,10	<0,2	<0,02
oktoober (1) 2012	<0,2	0,09	<0,2	0,09	<0,2	0,10
oktoober (2) 2012	<0,2	<0,02	<0,2	0,11	0,3	<0,02
oktoober (3) 2012	<0,2	<0,02	<0,2	0,20	0,5	0,14
oktoober (4) 2012	0,3	0,29	<0,2	0,03	0,6	0,12
oktoober (5) 2012	0,4	0,04	<0,2	0,05	<0,2	<0,02
november (1) 2012	0,5	0,02	0,2	0,05	0,2	0,02
november (2) 2012	<0,2	<0,02	<0,2	0,03	<0,2	<0,02
november (3) 2012	<0,2	<0,02	<0,2	0,03	<0,2	<0,02
november (4) 2012	0,2	0,02	<0,2	0,02	0,2	0,02

Joonis 4 Glüfosaadi proovivõtukohad

(täpsem kaart: <https://maps.google.com/maps/ms?msid=216254788535147165923,0004bdb991833c326a6c2&msa=0>)



Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja töötada metoodika glüfosaadi ja AMPA määramiseks looduslikus vees kasutades ioon-lõks massispektromeetrit, määrata analüütide sisaldused Võrtsjärves ning selle vesikonnas asuvates jõgedes (Tänassilma, Tarvastu, Ohne, Väike Emajõgi, Suur Emajõgi) ja kahes Võrtsjärve lähedal asuvas põlluäärses piirikraavis (Kobilu ja Konguta) vahemikus mai 2011 kuni mai 2012 (piirikraavides kuni november 2012) ning tuua välja kirjanduses varem kirjeldamata kitsaskohad SPE HPLC/ESI/MS põhinevatel glüfosaadi määramismetoodikates.

Käesoleva töö tulemusena töötati välja ja optimeeriti metoodika glüfosaadi määramiseks looduslikus vees ning kasutati seda Võrtsjärve vesikonna glüfosaadi sisalduse monitooringuks grandis ETF8373 raames. Lisaks sellele näidati, et SPE HPLC/ESI/MS metoodika glüfosaadi määramiseks võib omada ulatuslikku ME, mida saab vähendada optimeerides prooviruumala ning HPLC gradienti ja puhvri koostist. Samuti näidati, et ^{13}C -glüfosaat võib põhjustada ME, mis on heas kooskõlas Enke poolt koostatud matemaatilise mudeliga. Näidati, et boraatpuhver põhjustab glüfosaat-FMOC derivaadi lagunemist proovi kokkuaurutamisel ja mõjutab glüfosaadi t_r . Näidati, et MS ei pruugi analüüdi ja 1 Da erinevusega isotoopmärgistatud sisestandardite kontsentratsioone ühel jooksul adekvaatselt hinnata ilma MS parameetrite optimeerimiseta.

Metoodika parendamiseks saaks kasutusele võtta suurema massierinevusega glüfosaadi isotoopmärgistatud sisestandardi, et oleks võimalik analüüsida analüüdid ühe jooksuga ning seega võtta arvesse ka erinevast süstisuurusest tulenev korduvus. AMPA sisalduste adekvaatseks hindamiseks tuleks kasutusele võtta vastav isotoopmärgistatud sisestandard ning optimeerida metoodika parameetrid selle kasutamiseks.

Evaluation and solving of crucial problems in glyphosate groundwater analysis with SPE HPLC/ESI/MS

Vahur Toss

Summary

Glyphosate is one of the most widely used broad-spectrum post-emergence herbicides which is mainly used in agriculture and forestry most often as a component of Monsanto Company's product called Roundup. The need for monitoring of glyphosate levels in natural waters arises from its wide use and controversy surrounding its toxicity.

The aim of these thesis was to develop a method for determining glyphosate in natural waters using HPLC/ESI/MS system in the Testing Centre of University of Tartu and monitor glyphosate levels in Võrtsjärve river basin starting from May 2011 until May 2012 (until November 2012 in two ditches). The monitoring was done with waters from lake Võrtsjärv, rivers surrounding it Tännassilma, Tarvastu, Ohne, Väike Emajõgi, Suur Emajõgi and in two streams draining agricultural fields (Kobilu, Konguta).

Surface water samples were collected in the framework of a glyphosate monitoring project from southern Estonia and stored in plastic bottles at -20°C. The samples were warmed up prior to the analysis using ¹³C-glyphosate as internal standard and derivatization with FMOC-Cl. Sample pre-concentration was carried out using SPE and sample drying under nitrogen flow after which glyphosate and AMPA levels were determined using HPLC/ESI/MS system.

Since LoQ can change from sample to sample 0.2 µg/l was accepted as LoQ because it could be observed even in samples where process efficiency was lowest. The average trueness using ¹³C-glyphosate correction was 79% ± 20% (n=6) for spiked (0,2 and 1 µg/l) groundwater samples containing glyphosate below LoD which is acceptable for trace analysis.

Glyphosate and AMPA levels exceeded LoD at least once in every monitored area. In lake Võrtsjärv glyphosate exceeded LoD once (0.3 µg/l, August 2011) and AMPA four times (highest 0.63 µg/l, August 2011). Highest glyphosate and AMPA levels monitored in the rivers of interest were from Suur Emajõgi (3.4 µg/l of glyphosate in June 2011 and 0.69 µg/l of AMPA in July 2011). The highest glyphosate concentration appeared in Kobilu dich (5.0 µg/l, October 2011) and highest AMPA concentration in Konguta dich (0.36 µg/l May 2012).

In conclusion it can be said that method to determine glyphosate and AMPA from natural waters was developed. This method was used to monitor glyphosate and AMPA concentrations in Vörtsjärvi river basin in the framework of the project ETF8373.

Kasutatud kirjandus

- [1] M. Cuhra, T. Traavik, T. Bohn, Clone- and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 22 (2013) 251.
- [2] A.L. Williams, R.E. Watson, J.M. DeSesso, Developmental and reproductive outcomes in humans and animals after glyphosate exposure: a critical analysis. *J Toxicol. Env. Heal. B* 15 (2012) 39.
- [3] S. Dousset, C. Chauvin, P. Durlot, M. Thevenot, Transfer of hexazinone and glyphosate through undisturbed soil columns in soils under Christmas tree cultivation. *Chemosphere* 57 (2004) 265.
- [4] F.C. Chang, M.F. Simcik, P.D. Capel, Occurrence and fate of the herbicide glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere. *Environ. Toxicol. Chem.* 30 (2011) 548.
- [5] E. Hietanen, K. Linnainmaa, H. Vainio, Effects of phenoxyherbicides and glyphosate on the hepatic and intestinal biotransformation activities in the rat. *Acta Pharmacol. Tox.* 53 (1983) 103.
- [6] R.J. Menendez-Helman, G.V. Ferreyroa, M. dos Santos Afonso, A. Salibian, Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. *B. Environ. Contam. Tox.* 88 (2012) 6.
- [7] L.J. Moore, L. Fuentes, J.H. Rodgers, Jr., W.W. Bowerman, G.K. Yarrow, W.Y. Chao, W.C. Bridges, Jr., Relative toxicity of the components of the original formulation of Roundup to five North American anurans. *Ecotox. Environ. Safe.* 78 (2012) 128.
- [8] P.J. Peruzzo, A.A. Porta, A.E. Ronco, Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environ. Pollut.* 156 (2008) 61.
- [9] D.R. Lide, CRC Handbook of Chemistry and Physics 85th edition. CRC Handbook of Chemistry and Physics 85th edition (2005).
- [10] C.D. Stalikas, C.N. Konidari, Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides. *J. Chromatogr. A* 907 (2001) 1.

- [11] M. Oss, A. Krueve, K. Herodes, I. Leito, Electrospray Ionization Efficiency Scale of Organic Compounds. *Anal. Chem.* 82 (2010) 2865.
- [12] Y.B. Si, Y. Xiang, C. Tian, X.Y. Si, J. Zhou, D.M. Zhou, Complex Interaction and Adsorption of Glyphosate and Lead in Soil. *Soil Sediment Contam.* 22 (2013) 72.
- [13] M. Ibáñez, Ó.J. Pozo, J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 145.
- [14] J. Patsias, A. Papadopoulou, E. Papadopoulou-Mourkidou, Automated trace level determination of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water by on-line anion-exchange solid-phase extraction followed by cation-exchange liquid chromatography and post-column derivatization. *J. Chromatogr. A* 932 (2001) 83.
- [15] M.N. Marques, E.A. Passos, M.T.S. da Silva, F.O. Correia, A.M.O. Santos, S.S. Gomes, J.P.H. Alves, Determination of glyphosate in water samples by IC. *J. Chromatogr. Sci.* 47 (2009) 822.
- [16] W.M. Niessen, P. Manini, R. Andreoli, Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 25 (2006) 881.
- [17] S.J. Lee, S. Park, J.Y. Choi, J.H. Shim, E.H. Shin, J.H. Choi, S.T. Kim, A.M.A. El-Aty, J.S. Jin, D.W. Bae, S.C. Shin, Multiresidue analysis of pesticides with hydrolyzable functionality in cooked vegetables by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* 23 (2009) 719.
- [18] H. Stahnke, S. Kittlaus, G. Kempe, L. Alder, Reduction of matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry by dilution of the sample extracts: how much dilution is needed? *Anal. Chem.* 84 (2012) 1474.
- [19] C.G. Enke, A predictive model for matrix and analyte effects in electrospray ionization of singly-charged ionic analytes. *Anal. Chem.* 69 (1997) 4885.
- [20] A. Kloefer, J.B. Quintana, T. Reemtsma, Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography–electrospray ionisation-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 153.

- [21] A. Van Eeckhaut, K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders, Y. Michotte, Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 2198.
- [22] K.M. Karlsson, L.E.M. Spoof, J.A.O. Meriluoto, Quantitative LC-ESI-MS analyses of microcystins and nodularin-R in animal tissue - Matrix effects and method validation. *Environ. Toxicol.* 20 (2005) 381.
- [23] K. Bester, G. Bordin, A. Rodriguez, H. Schimmel, J. Pauwels, G. Van Vyncht, How to overcome matrix effects in the determination of pesticides in fruit by HPLC-ESI-MS-MS. *Fresen. J. Anal. Chem.* 371 (2001) 550.
- [24] I.R. Pizzutti, A. de Kok, M. Hiemstra, C. Wickert, O.D. Prestes, Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4539.
- [25] P. Manini, R. Andreoli, A. Mutti, Application of liquid chromatography-mass spectrometry to biomonitoring of exposure to industrial chemicals. *Toxicol. Lett.* 162 (2006) 202.
- [26] A. Krueve, K. Herodes, I. Leito, Optimization of electrospray interface and quadrupole ion trap mass spectrometer parameters in pesticide liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry analysis. *Rapid Commun. Mass Sp.* 24 (2010) 919.
- [27] M. Villagrasa, M. Guillamon, E. Eljarrat, D. Barcelo, Matrix effect in liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry analysis of benzoxazinoid derivatives in plant material. *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 108.
- [28] S. Kowal, P. Balsaa, F. Werres, T.C. Schmidt, Determination of the polar pesticide degradation product N,N-dimethylsulfamide in aqueous matrices by UPLC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 1787.
- [29] B.K. Choi, A.I. Gusev, D.M. Hercules, Postcolumn introduction of an internal standard for quantitative LC-MS analysis. *Anal. Chem.* 71 (1999) 4107.
- [30] J.C. Van De Steene, K.A. Mortier, W.E. Lambert, Tackling matrix effects during development of a liquid chromatographic-electrospray ionisation tandem mass spectrometric analysis of nine basic pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *J. Chromatogr. A* 1123 (2006) 71.

- [31] J. Zrostlikova, J. Hajslova, J. Poustka, P. Begany, Alternative calibration approaches to compensate the effect of co-extracted matrix components in liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues in plant materials. *J. Chromatogr. A* 973 (2002) 13.
- [32] T. Berg, D.H. Strand, ¹³C labelled internal standards-a solution to minimize ion suppression effects in liquid chromatography-tandem mass spectrometry analyses of drugs in biological samples? *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 9366.
- [33] C. Chin, Z.P. Zhang, H.T. Karnes, A study of matrix effects on an LC/MS/MS assay for olanzapine and desmethyl olanzapine. *J. Pharmaceut. Biomed.* 35 (2004) 1149.
- [34] H.R. Liang, R.L. Foltz, M. Meng, P. Bennett, Ionization enhancement in atmospheric pressure chemical ionization and suppression in electrospray ionization between target drugs and stable-isotope-labeled internal standards in quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Sp.* 17 (2003) 2815.
- [35] I. Hanke, H. Singer, J. Hollender, Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 2265.
- [36] V. Toss, Glüfosaadi määramine looduslikus vees HPLC/ESI/MS metoodikaga. Tartu (2011).
- [37] L.P. Morin, J.N. Mess, M. Furtado, F. Garofolo, Reliable procedures to evaluate and repair crosstalk for bioanalytical MS/MS assays. *Bioanalysis* 3 (2011) 275.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Vahur Toss_____

(autori nimi)

(sünnikuupäev: 04.03.1988_____)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Glüfosaadi määramine pinnaveest SPE HPLC/ESI/MS/MS metoodikaga: kitsaskohad ja nende lahendamine_____

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on Anneli Kruve, PhD_____

(juhendaja nimi)

reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 21.05.2013